



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS EM
ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO POR MEIO DE SPME E GC-MS**

MARIA JOHANN FENSTERSEIFER

Florianópolis
Novembro/2018

Maria Johann Fensterseifer

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS EM
ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO POR MEIO DE SPME E GC-MS**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Orientador

MSc. Anderson Luiz Oenning
Co-orientador

Florianópolis
Novembro/2018

*Dedico este trabalho ao meu pai Paulo, a minha
mãe Regina, ao meu irmão Francisco e aos
meus avós Helmuth, Ermínia, Maria e Hary.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, a vida, ao universo, a saúde que me permitiu seguir meus objetivos, e a tudo que contribuiu para que eu tivesse esta oportunidade. Agradeço especialmente aos meus pais pelo suporte emocional e financeiro, as inúmeras passagens de ida e volta a Ijuí, aos conselhos, incentivos e amor. Obrigada, amo vocês!

Obrigada a todos os professores e escolas que passei: Soares de Barros, EFA, CTBM. Especialmente aos professores de química, Adriane Bini e português, Maristela Lang. À UFSC e ao departamento de química, pelo ensino gratuito e de qualidade. Pelos professores que tive o prazer de conhecer e que contribuíram para minha formação.

Agradeço especialmente ao professor Eduardo Carasek, meu orientador, a oportunidade de ter realizado este trabalho no laboratório CroMaas, pela confiança, pela compreensão, suporte e transmissão de conhecimentos. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador, Anderson: grata por ter aceitado essa missão! Pela disponibilidade, paciência, conselhos, recomendações e correções infinitas. Muito obrigada por ter me ajudado no desenvolvimento deste trabalho, pelos feriados e finais de semana no laboratório, e por todos os dias desta caminhada. E a todos integrantes do CroMaas: obrigada por terem me acolhido, por toda a ajuda que me deram durante as prévias, transmitindo seus aprendizados de vida acadêmica para alguém que ainda está no início, pelos momentos de descontração, pela compreensão quando precisei de prioridade para usar o equipamento, pelos momentos de conforto e conselhos quando as coisas não iam tão bem, e por dividirem comigo seus conhecimentos.

Agradeço aos meus familiares, avós, tios, tias, primos, primas, pelos momentos divididos, pelas mensagens carinhos, pelos mimos, pela ajuda que recebi logo que cheguei, em especial: vó Ermínia, vó Maria, tia Isa, Téi, Dione, Iliane, Tia lara e tio Luiz, e Emília e Amanda.

Aos amigos e amigas queridas, uns que conheço desde o nascimento, outros na escola, e no decorrer da vida: Nicole, Julia, Fabiola, Kauana, Daiara, Bethina, Felipe, Anna, Ana Weiler. A vocês, minha gratidão pela amizade e pela oportunidade de dividir tantos momentos, especialmente este.

Aos presentes que a graduação em química me trouxe, desde o primeiro dia de aula de Cálculo I no elevador do EFI: Mariana, Mateus e Carlos que me acompanham desde o início desta jornada, muito obrigada pelos inúmeros momentos divididos, desde estudos, RU's, coxinhas, estudos bem e mal sucedidos, relatórios que pareciam infinitos, enfim. Me sinto muito feliz e grata por ter pessoas como vocês na minha vida!

Aos que apareceram pelo caminho, mas não menos importantes: Renan (que tanto me ensina com sua maturidade e paciência), Roberto, que se tornou mais que um amigo, meu namorado e parceiro, obrigada por me lembrar da minha capacidade nas vezes em que esqueci (espero fazer o mesmo quando você precisar), por me aguentar triste, cansada, nervosa, cheia de aulas e coisas pra fazer, obrigada pelas inúmeras jantas e almoços quando eu estava sem tempo pra nada, por me incentivar sempre e dividir tanta coisa, amo você! E a Luisa, a amizade que veio “de brinde” com esses dois, minha vizinha que com quem também divido tantas coisas. Agradeço a vocês pelos roles, pelos tantos estudos e exercícios no quadro, por tudo!

Agradeço aos meus segundos pais, minhas madrinhas e padrinhos: Michele, Alberto, Janite e Alex. Obrigada pela oportunidade de conviver com vocês e trocar tantas experiências, conselhos, risadas, viagens e outros tantos momentos únicos.

Enfim, meus mais sinceros agradecimentos e sentimentos de gratidão por todos que de alguma forma contribuíram para esta conquista, tornando minha caminhada até aqui e o início da vida acadêmica mais completos e felizes.

SUMÁRIO

1		
2	1 INTRODUÇÃO	11
3		
4	2 REVISÃO DA LITERATURA	13
5	2.1 Agrotóxicos organoclorados	13
6	2.2 Preparo de amostra	18
7	2.3 Microextração em fase sólida	20
8	2.3.1 Parâmetros otimizados na técnica de SPME	24
9	2.3.1.1 Recobrimento da fibra	24
10	2.3.1.2 Adição de sal	24
11	2.3.1.3 Seleção do modo de extração	25
12	2.3.1.4 Tempo de extração	25
13	2.3.1.5 Temperatura de extração	26
14	2.3.1.6 Agitação da amostra	26
15	2.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	26
16		
17	3 OBJETIVOS	29
18	3.1 Objetivo geral	29
19	3.2 Objetivos específicos	29
20		
21	4 METODOLOGIA	30
22	4.1 Materiais e reagentes	30
23	4.2 Amostras	30
24	4.3 Instrumentação e condições cromatográficas	31
25	4.4 Otimização dos parâmetros da técnica de SPME	32
26	4.4.1 Otimização da escolha do recobrimento da fibra de SPME	33
27	4.4.2 Otimização do tempo e temperatura de extração e porcentagem de	
28	sal	33
29	4.5 Validação da metodologia desenvolvida	34
30	4.6 Programas utilizados na análise dos dados	35

1	4.7 Segurança e tratamento de resíduos	35
2		
3	5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4	5.1 Otimização da separação cromatográfica	36
5	5.2 Otimização dos parâmetros de extração da técnica de SPME.....	37
6	5.2.1 Recobrimento da fibra.....	37
7	5.2.2 Adição de sal, temperatura e tempo de extração	37
8	5.3 Validação da metodologia	40
9	5.4 Comparação da metodologia proposta com outros da literatura	49
10	5.5 Aplicação da metodologia desenvolvida	50
11		
12	6 CONCLUSÕES.....	51
13		
14	REFERÊNCIAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) *Holder* e agulha contendo a fibra, não acoplados. B) Agulha já inserida no *holder* com a fibra retraída. C) Agulha inserida no *holder* com a fibra exposta.

Figura 2. Representação esquemática de procedimento de extração por SPME e de dessorção térmica no cromatógrafo gasoso.

Figura 3. Representação dos modos de extração utilizados em SPME. a) DI-SPME: imersão direta. b) HS-SPME: *headspace*.

Figura 4. Esquema básico de um cromatógrafo gasoso, sendo: 1) Fonte de gás de arraste; 2) controlador de vazão e regulador de pressão; 3) sistema de injeção da amostra; 4) coluna cromatográfica; 5) sistema de detecção; 6) sistema de registro e tratamento de dados.

Figura 5. Cromatograma da separação cromatográfica obtido no GC-MS no modo SCAN com a injeção de 1 μL da mistura de padrões de concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ no modo *splitless*.

Figura 6. Gráfico da otimização da escolha do recobrimento da fibra.

Figura 7. Superfícies de resposta obtidas na extração de agrotóxicos organoclorados por DI-SPME com a fibra DVB/Car/PDMS. (A) tempo de extração *versus* temperatura. (B) temperatura *versus* % de NaCl. (C) Tempo de extração *versus* % de NaCl.

Figura 8. Tabela ANOVA obtida para o planejamento composto central.

Figura 9. Resultado gráfico obtido pela análise de robustez.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações físico-químicas dos analitos estudados nesse trabalho.

Tabela 2. Informações dos íons em relação às razões massa/carga dos analitos.

Tabela 3. Planejamento composto central empregado para otimização da extração de pesticidas organoclorados por DI-SPME utilizando a fibra DVB/Car/PDMS.

Tabela 4. Dados de operação do GC-MS e resultados da otimização dos parâmetros da SPME.

Tabela 5. Comparação entre as equações da reta gerados a partir das curvas de calibração realizadas em água ultrapura e na matriz aquosa.

Tabela 6. Porcentagens de recuperação superiores a 100% para alguns agrotóxicos em diferentes matrizes.

Tabela 7. Equação da reta, faixa linear de trabalho, coeficiente de determinação, limite de detecção e de quantificação para os analitos estudados nesse trabalho.

Tabela 8. Agrotóxicos organoclorados em estudo e Valores Máximos Permitidos em água destinada para o consumo humano.

Tabela 10. Resultados obtidos através de ensaios de recuperação para a avaliação da exatidão e precisão do método desenvolvido.

Tabela 11. Relação entre as condições nominais e variações dos parâmetros analisados para avaliação da robustez.

Tabela 12. Combinação dos parâmetros e suas variações nos experimentos realizados para avaliação da robustez.

Tabela 13. Valores de faixa linear, limite de quantificação e detecção encontrados na literatura para alguns dos analitos estudados.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 1 SPME – Microextração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*
- 2 GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês
- 3 *Gas Chromatography Mass Spectrometry*
- 4 DI-SPME- Microextração em fase sólida com imersão direta, do inglês *Direct*
- 5 *Imersion - Solid Phase Microextraction*
- 6 HS-SPME – Microextração em fase sólida por *headspace*, do inglês *Headspace -*
- 7 *Solid Phase Microextraction*
- 8 PDMS - Polidimetilsiloxano
- 9 PA - Poliacrilato
- 10 DVB – Divnilbenzeno
- 11 CAR - Carboxen
- 12 ABRASCO – Associação Brasileira de Saúde Coletiva
- 13 ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- 14 MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- 15 INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- 16 RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
- 17 4,4-DDD - 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano
- 18 4,4-DDE - 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)eteno
- 19 SIM - monitoramento de íon selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*.

RESUMO

Neste trabalho foi proposto a utilização da microextração em fase sólida (SPME) como técnica de extração na etapa de preparo de amostra para a determinação de agrotóxicos organoclorados em amostras de água provenientes de estações de tratamento de três diferentes cidades catarinenses. Os compostos organoclorados escolhidos para serem estudados foram o lindano, aldrin, clordano, α -endosulfan, 4,4-DDE, dieldrin, endrin, β -endosulfan, 4,4-DDD e o endosulfan sulfato. A separação e a identificação foram realizadas inicialmente em um GC-ECD e o procedimento de validação e aplicação da metodologia proposta foi realizada em um GC-MS. A extração dos analitos foi realizada no modo de imersão direta com uma fibra comercial de DVB/Car/PDMS de 2 cm de comprimento. A temperatura de extração foi de 70°C e a mesma ocorreu sob agitação na velocidade de 1000 rpm com duração de 80 minutos. O tempo de dessorção térmica no injetor do cromatógrafo foi de 7 minutos e a corrida cromatográfica durou 29 minutos. A faixa linear de trabalho para a determinação dos dez analitos estudados foi de 20 ng L⁻¹ a 400 ng L⁻¹, sendo os limites de detecção e quantificação obtidos de 6 ng L⁻¹ e 20 ng L⁻¹, respectivamente. Os ensaios de recuperação variaram de 57% a 122%, a precisão intra-dia e inter-dia obtidas em valores de desvio padrão relativo foram menores que 20% e a metodologia se mostrou robusta através de um ensaio de robustez. Os resultados obtidos para os limites de quantificação para a determinação dos analitos estão abaixo dos valores máximos permitidos desses compostos em água estabelecidos pela legislação brasileira, confirmando assim que a metodologia proposta nesse trabalho é adequada e pode ser aplicada em análises de água para consumo humano provenientes de estações de tratamento de água.

Palavras-chave: agrotóxicos, organoclorados, água, SPME, GC-MS.

1 INTRODUÇÃO

Pode-se considerar que a inserção de produtos químicos na sociedade é cada vez mais significativa, e que a indústria química está presente nos mais diversos segmentos. Porém, é necessário refletir sobre os prejuízos decorrentes do uso excessivo de produtos químicos, que podem, muitas vezes, estarem associados a consequências negativas tanto para os seres humanos quanto para o meio ambiente como um todo.

Vindo ao encontro disso, temos uma ampla classe de compostos produzidos pela indústria química a fim de tornar o cultivo de alimentos como grãos, frutas, verduras e legumes mais viáveis em vários aspectos como a produção em grande quantidade e com alto rendimento, proteção a possíveis pragas, e, de maneira geral, evitando danos nos processos de produção, beneficiamento, armazenamento, transporte e distribuição dos itens de interesse. A esses compostos dá-se o nome de agrotóxicos, defensivos agrícolas e/ou agentes fitossanitários.

A exposição das pessoas a essas classes de substâncias tóxicas pode ocorrer de algumas maneiras, entre elas pode-se citar a ingestão de água contaminada, por isso, é importante que sejam estabelecidos parâmetros rígidos de análise da mesma, coerentes com a realidade do país e as atividades nele desenvolvidas a fim de monitorar com segurança a presença de agentes nocivos. No Brasil, os órgãos responsáveis por estabelecer tais parâmetros são a ANVISA e o Ministério da Saúde.

Muitas vezes, as substâncias às quais exijam controle, se encontram em baixas concentrações, ou ainda, presentes em amostras cuja matriz é considerada complexa, características estas que podem dificultar a análise da amostra e determinação dos analitos. A fim de minimizar estes fatores, a etapa de preparo de amostra surge como uma alternativa para isolar, extrair e pré-concentrar o analito, tornando possível sua determinação com maior fidelidade ao contexto/ à realidade.

Normalmente, os procedimentos de preparo de amostra tradicionais são lentos, trabalhosos e demandam uma quantidade significativa de solventes, que prejudicam a saúde do analista, aumentam o risco de contaminação e dificultam a gestão de resíduos do laboratório, além de ser prejudicial ao meio ambiente. Por isso, a necessidade de se desenvolver novas metodologias que contemplem

características como: baixo custo, facilidade de operação, sensibilidade adequada, uso de solventes reduzido ou nulo, entre outros.

As técnicas de microextração que são aplicadas no preparo de amostra vêm ao encontro das características citadas, começaram a ser utilizadas nos anos 90, e desde então têm sido cada vez mais difundidas por atenderem vários pré-requisitos, principalmente em relação aos princípios de química verde. A microextração em fase sólida é uma das alternativas, apresentando bons níveis de sensibilidade, aplicabilidade significativa em relação à diversidade de analitos, bem como de matrizes consideradas complexas, obtendo, mesmo assim, bons resultados analíticos.

Neste trabalho, será discutido o uso da microextração em fase sólida (SPME) como técnica de preparo de amostra e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) para identificar agrotóxicos pertencentes ao grupo dos organoclorados em amostras de água provenientes de estação de tratamento de água de diferentes cidades catarinenses.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Agrotóxicos organoclorados

Sabe-se que a alimentação dos seres humanos passou e ainda passa por inúmeros processos desde seu início: formas de preparo, ingredientes, critérios que tornam uma ou outra coisa comestível, formas de obtenção, exportação e importação, processamento, adição de substâncias com o intuito de alterar sabor, durabilidade, aroma, e outras características. Porém, muito antes desses processos terem um papel significativo na sociedade, a alimentação do ser humano era restrita e muito simples, baseada em coleta de frutas e vegetais, seguida da introdução da carne em sua dieta. Sendo assim, era por meio da caça e da coleta que se obtinham os alimentos. A partir do momento em que o homem começou a estocar alimentos e armazená-los para um consumo também a médio e longo prazo, precavendo-se para os períodos de escassez, forma-se um cenário fértil para a proliferação de pragas, visto que terão alimento em abundância disponível para sua reprodução, e surge um novo desafio para os seres humanos: como conservar esses alimentos, e mantendo-os em boas condições para consumo? ¹

Para combater os insetos e pragas nos alimentos armazenados, eram utilizados, antes, da primeira grande guerra, enxofre e piretro, este último, proveniente das folhas do *Chrysanthemum cinerariaefolium*, que mais tarde seria considerado o primeiro “agrotóxico natural” e modificado quimicamente para maior disponibilidade. A partir da 1ª Guerra Mundial, foram desenvolvidos os primeiros agrotóxicos, sendo amplamente utilizados na 2ª Guerra Mundial como armas químicas, e somente, depois como defensivos agrícolas. Em meados dos anos 60, com a chamada revolução verde (programa do governo no qual os agricultores recebiam incentivos fiscais ao comprovarem a compra de agrotóxicos) o uso foi amplamente difundido pelo Brasil.¹

Em 1989 a Lei Federal nº 7.802, através do Decreto 98.816, em seu Artigo 2º, Inciso I, trata sobre os agrotóxicos e os definem como “*produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas*”. ²

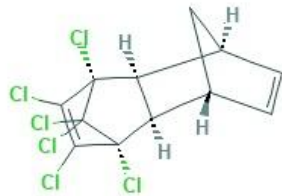
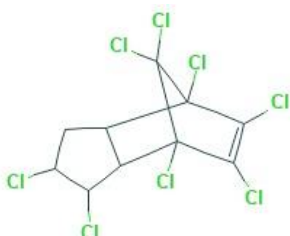
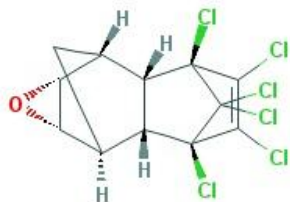
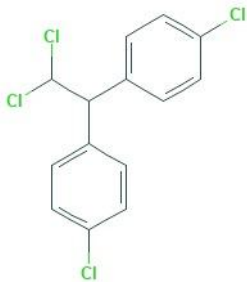
Já no ano 2001, na conferência de Estocolmo, 90 países, incluindo o Brasil, assinaram um tratado no qual foram classificados alguns agrotóxicos como altamente perigosos, constituindo a chamada “dúzia suja” que deveriam ser banidos,

tendo seu uso e comercialização proibidos. Essa lista é composta, em sua maioria, por organoclorados e contém alguns dos analitos estudados no presente trabalho como mostrado na Tabela 1. Devido ao grande número de formulações e princípios ativos deste tipo de compostos, os agrotóxicos são classificados tanto pela sua forma de ação (inseticidas, fungicidas, herbicidas, entre outros) quanto ao grupo químico no qual estão incluídos (organoclorados, organofosforados e carbamatos).

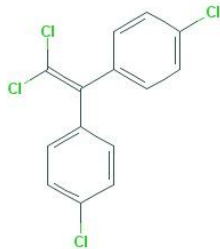
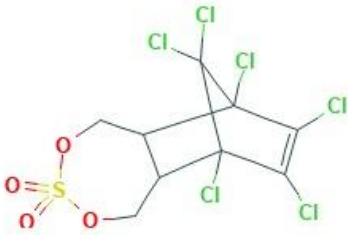
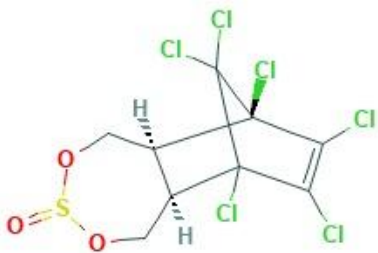
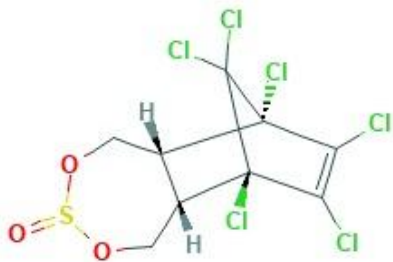
3,4

Os grupos químicos citados pertencem à classe dos organossintéticos, sendo os agrotóxicos organoclorados compostos por carbono, hidrogênio e cloro. Algumas das principais características desta classe são: insolubilidade em água; solubilidade em líquidos apolares e conseqüentemente em óleos e gorduras, o que os torna passíveis de acumulação no tecido adiposo dos organismos vivos e aliado à sua alta estabilidade, demoram muitos anos para serem degradados na natureza. Além disso, os organoclorados, ao entrarem em contato com o organismo, podem atuar negativamente no sistema nervoso, além de outros prejuízos à saúde. Segundo pesquisas desenvolvidas pela Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO) e Ministério da Saúde – Fundação Oswaldo Cruz, os agrotóxicos podem ser responsáveis por problemas neurológicos, motores e mentais, distúrbios de comportamento, problemas na produção de hormônios sexuais, infertilidade, puberdade precoce, má formação fetal, aborto, doença de Parkinson, endometriose, atrofia dos testículos e câncer de variados tipos. ^{4,5,6}


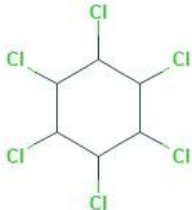
Tabela 1. Informações físico-químicas dos analitos estudados nesse trabalho.

Analito	Fórmula molecular e estrutural	Temperatura de ebulição (°C)	log P
Aldrin	$C_{12}H_8Cl_6$	145	6,5
			
Clordano	$C_{10}H_6Cl_8$	175	2,8
			
Dieldrin	$C_{12}H_8Cl_6O$	385	3,7
			
4,4-DDD	$C_{14}H_{10}Cl_4$	350	6,0
			

Continuação. **Tabela 1.** Informações físico-químicas dos analitos estudados nesse

Analito	Fórmula molecular e estrutural	Temperatura de ebulição (°C)	log P
4,4-DDE	$C_{14}H_{10}Cl_4$	336	6,5
			
Endosulfan-sulfato	$C_9H_6Cl_6O_4S$	480 ± 45	3,2
			
α - endosulfan	$C_9H_6Cl_6O_3S$	481	4,8
			
β - endosulfan	$C_9H_6Cl_6O_3S$	449	4,8
			

Continuação. **Tabela 1.** Informações físico-químicas dos analitos estudados nesse trabalho.

Analito	Fórmula molecular e estrutural	Temperatura de ebulição (°C)	log P
Endrin	$C_{12}H_8Cl_6O$		
		416	3,2
Lindano	$C_6H_6Cl_6$		
		323,4	3,5

Fonte: PubChem, Pesticide Properties DataBase e ChemSpider (2018).^{7,8,9}

A exposição aos agrotóxicos pode ocorrer de diferentes maneiras, seja ela por via oral, dérmica ou por inalação, sendo que os trabalhadores do campo e as comunidades que vivem nas áreas rurais pertencem ao grupo de risco mais alto para a contaminação, seguido de crianças, idosos, gestantes e lactantes.^{4,5,6} Pode-se considerar ainda como uma maneira de exposição aos agrotóxicos a ingestão de água contaminada, proveniente de escoamento intencional ou superficial em rios utilizados na captura de água e das águas subterrâneas contaminadas a partir de derramamento de agrotóxicos no solo.⁵

A água, aparentemente pura e cristalina, que chega às torneiras da população, provenientes de fontes de abastecimento que passaram por uma estação de tratamento, muitas vezes não se encontram em condições adequadas e seguras para consumo, já que processos inócuos e obsoletos, bem como protocolos defasados e parâmetros científicos ultrapassados são utilizados para a análise das

amostras.⁵ Os agrotóxicos, na maioria das vezes, encontram-se em concentrações muito baixas nessas amostras, sendo assim, é necessário adotar um procedimento de preparo de amostra adequado para possibilitar a determinação da concentração destes nas amostras.⁴

2.2 Preparo de amostra

A química analítica tem como foco explorar as técnicas, procedimentos e conceitos envolvidos nas etapas necessárias para que se obtenham informações sobre uma substância de interesse. A partir da escolha do analito e das técnicas adotadas para a determinação do mesmo, são necessários vários cuidados durante os procedimentos, considerando que etapas como amostragem e preparo da amostra são, por enquanto, pouco automatizadas, e, portanto, mais suscetíveis a erros, que dificilmente podem ser corrigidos. Sendo assim, **requerem muita atenção**, pois podem comprometer a análise como um todo.¹⁰

Na maioria das vezes, não é possível analisar a amostra de forma direta, por isso, a necessidade do preparo de amostra, tendo como objetivo tornar o analito passível de determinação, a partir de processos de extração, isolamento e concentração, já que muitas vezes o mesmo se encontra em baixas concentrações e/ou em matrizes complexas com possíveis interferentes, o que pode danificar o instrumento analítico caso a amostra seja analisada na sua forma bruta ou sem um preparo adequado.^{10,11}

As técnicas clássicas de preparo de amostra utilizadas tradicionalmente são processos demorados, trabalhosos e requerem uma quantidade significativa de solventes orgânicos. Todos estes fatores estimulam o desenvolvimento de metodologias mais viáveis que atendam alguns requisitos importantes, são eles: baixo custo, rapidez, facilidade de execução, compatibilidade com o instrumento de análise, utilização mínima ou nula de solventes, redução do número de etapas da análise e se possível, processos automatizados a fim de reduzir o manuseio da amostra.^{12,13}

Um dos exemplos de técnica clássica de preparo de amostra é a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), que por sua vez, já apresenta uma vantagem em relação a outras por utilizar menores volumes de solventes orgânicos. Entretanto, os cartuchos utilizados para SPE são usados somente uma

vez, sendo esta uma característica que a faz ter alto custo e geração significativa de resíduos. Os princípios da técnica de SPE são baseadas na extração dos analitos a partir de uma superfície sólida seguida de dessorção com solvente que tenha maior afinidade com os analitos aderidos na fase extratora.¹⁴

As técnicas de microextração surgem então como alternativas que vêm ao encontro das características mencionadas acima. Estas possibilitam a extração e/ou pré - concentração dos analitos em micro - escalas e condições mais vantajosas de trabalho. Neste sentido, a microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*) vem recebendo bastante destaque nos últimos anos.¹⁴

2.3 Microextração em fase sólida

A técnica de SPME foi desenvolvida e proposta por Arthur e Pawliszyn em 1990, e desde então seu uso tem sido crescente, pois apresenta características desejáveis como simplicidade de operação, reduzido uso de solventes orgânicos diminuindo assim os riscos de contaminação e a geração de resíduos do laboratório, processos automatizados que reduzem o manuseio das amostras e possíveis erros, compatibilidade com sistemas analíticos principalmente a cromatografia gasosa.^{10,14,15}

Basicamente, o dispositivo utilizado para SPME consiste em um bastão de sílica fundida de 100 mm de comprimento, sendo que uma das extremidades é recoberta com um filme polimérico (que pode ser um único polímero ou uma mistura de vários tipos) ou um sólido adsorvente, que estará disperso no polímero (ou na mistura polimérica).¹⁰ A Figura 1 a seguir mostra a fibra e o dispositivo na qual a mesma é acoplada (*holder*).

Figura 1. A) *Holder* e agulha contendo a fibra, não acoplados. B) Agulha já inserida no *holder* com a fibra retraída. C) Agulha inserida no *holder* com a fibra exposta.

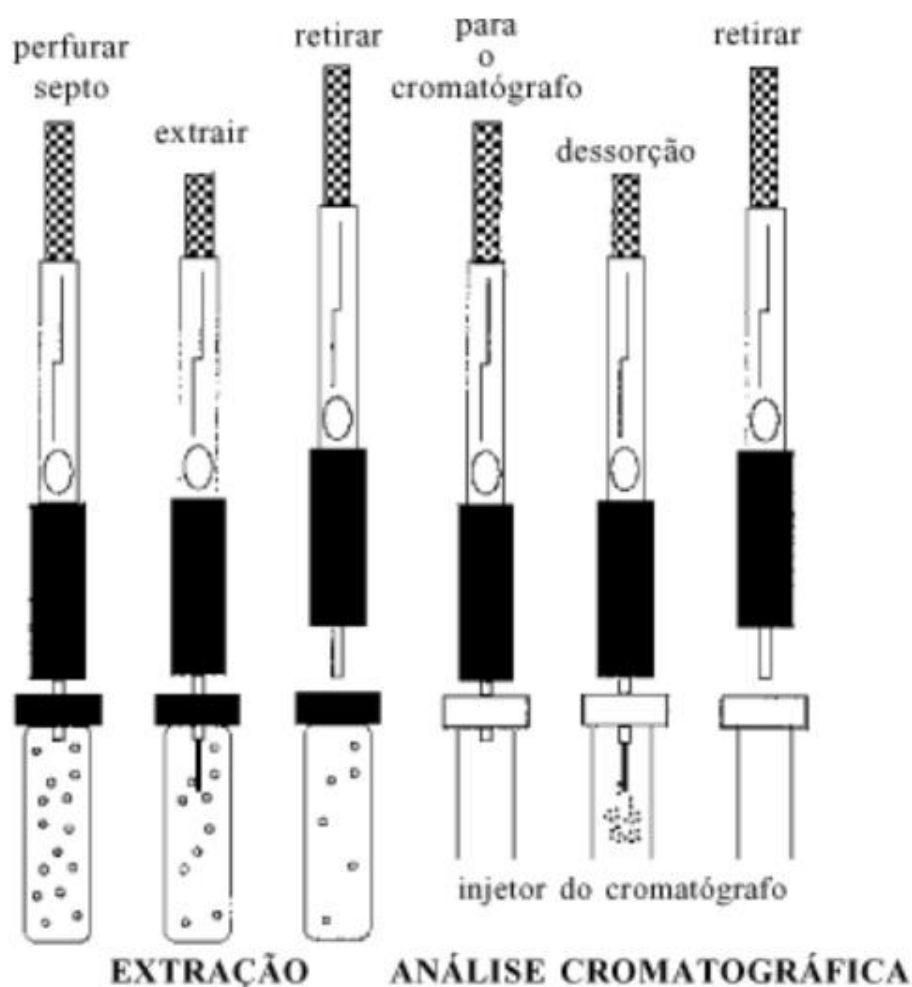


Fonte: Autoria própria (2018).

As etapas para extração dos analitos da amostra e dessorção no cromatógrafo são descritos a seguir e ilustrados na Figura 2. Primeiramente, com a

fibra retraída na agulha, perfura-se o septo do frasco de amostra para em seguida, expor a fibra à amostra ou ao seu vapor. Durante a extração, a sorção dos analitos presentes na amostra ocorre através do filme polimérico sorvente, estando o mesmo em contato com a amostra, se for uma extração com imersão direta (DI-SPME) ou exposto ao seu estado vaporizado, no caso da extração por *headspace* (HS-SPME). Decorrido o tempo de extração a fibra é retraída novamente e em seguida a agulha é retirada do septo e levada para que ocorra a dessorção térmica no cromatógrafo gasoso por um determinado tempo.¹⁶

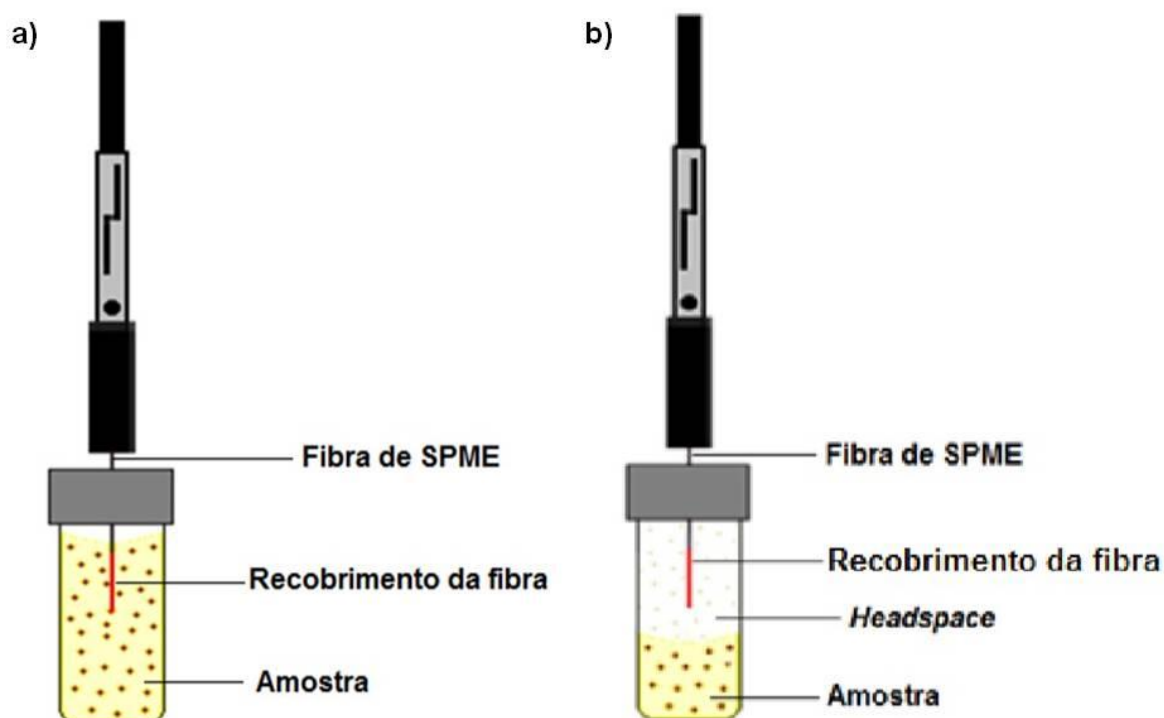
Figura 2. Representação esquemática de procedimento de extração por SPME e de dessorção térmica no cromatógrafo gasoso.



Fonte: VALENTE *et al* (2000).¹⁶

A Figura 3 a seguir exemplifica os modos de extração citados anteriormente, extração por imersão direta ou por *headspace*, respectivamente.

Figura 3. Representação dos modos de extração utilizados em SPME. a) DI-SPME: imersão direta. b) HS-SPME: *headspace*.



Fonte: Adaptado de MERIB (2013).¹⁷

Os fundamentos teóricos de SPME podem ser explorados com base no deslocamento das moléculas de analito da matriz até o recobrimento através da adsorção ou partição. Sendo assim, as resistências de transferências de massa devem ser superadas até que se tenha um equilíbrio (de adsorção ou partição) entre o analito remanescente na amostra e na fibra. Sendo assim, os fundamentos cinéticos de SPME baseiam-se na transferência de massa entre as fases, e o equilíbrio de partição do analito entre as mesmas é descrito por aspectos termodinâmicos.^{10,18}

Em se tratando de equilíbrio de extração em SPME, podemos considerar um sistema trifásico ideal, composto por uma fibra exposta em uma matriz aquosa em contato com o *headspace* (Figura 3b) Porém, deve-se considerar um sistema real como algo mais complexo, levando em conta que pode haver interações entre os

analitos, dos analitos com a parede do frasco e inclusive destes com o suporte da fibra.^{10,18}

Voltando ao sistema ideal trifásico, temos antes da extração (seja ela direta ou por *headspace*) uma quantidade de analito n_0 em concentração C_0 e volume V_m na matriz. Após a extração, estando o sistema em equilíbrio, a quantidade de analito descrita por n_0 estará agora distribuída entre as fases: matriz aquosa, fibra e *headspace*, identificadas respectivamente por n_m^e, n_f^e, n_h^e , e, considerando a conservação das massas, temos:^{10,13,18}

$$n = n_m^e + n_f^e + n_h^e \text{ (Equação 1)}$$

A concentração de analito em cada fase depende das constantes de distribuição fibra-*headspace* (Equação 2), *headspace*-matriz (Equação 3) e da constante de partição fibra-matriz (Equação 4). Sendo C_f^e, C_h^e, C_m^e as concentrações de analito na fibra, no *headspace* e na matriz, respectivamente.¹⁰

$$K_{fh} = \frac{C_f^e}{C_h^e} \text{ (Equação 2)} \quad K_{hm} = \frac{C_h^e}{C_m^e} \text{ (Equação 3)} \quad K_{fm} = \frac{C_f^e}{C_m^e} \text{ (Equação 4)}$$

Considerando que os volumes das fases sejam V_f^e, V_h^e e V_m^e as concentrações de analito em cada fase podem ser expressas através da razão entre o número de mols do analito e o volume da fase.¹⁰

A quantidade de analito extraída no equilíbrio (n_f^e) considerando C_0 pode ser obtida através de tratamentos matemáticos, resultando na Equação 5.¹⁰

$$n_f^e = \frac{K_{fm}V_fC_0V_m}{K_{fm}V_f + K_{hm}V_h + V_m} = Q \times C_0 \text{ (Equação 5)}$$

A constante Q na Equação 5 é uma combinação das variáveis operacionais, por exemplo: volume da amostra, fase extratora e *headspace* que podem ser fixadas, juntamente com as constantes de distribuição do analito nas diferentes fases (matriz, fibra e *headspace*). Desta forma, a quantidade de analito extraído n_f^e é diretamente proporcional à concentração inicial do analito presente na amostra C_0 , que é a base utilizada para a quantificação em SPME.^{10,13}

Estima-se que, nos primeiros 7 anos de utilização de SPME, sua aplicação principal era principalmente em matrizes aquosas.¹⁹ Mas, ao final da década de 90 as análises por SPME começaram a abranger uma diversidade maior de matrizes, como: solo, ar, alimentos, plantas, cabelo, produtos farmacêuticos, saliva, urina e sangue.²⁰⁻²³

2.3.1 Parâmetros otimizados na técnica de SPME

Na técnica de SPME alguns parâmetros podem e devem ser otimizados visando a máxima eficiência de extração dos analitos provenientes da matriz, deste modo, as principais variáveis que afetam a extração estão listadas abaixo:

2.3.1.1 Recobrimento da fibra

O principal fator a ser considerado para que se faça a escolha do recobrimento da fibra é a afinidade dos analitos em relação ao mesmo. Em geral, são avaliadas as características de polaridade dos analitos e do recobrimento, que devem ser semelhantes. Por exemplo, para analitos hidrofóbicos e pouco polares pode-se utilizar PDMS (polidimetilsiloxano), que é um recobrimento pouco polar, já para analitos com alta polaridade, pode-se utilizar poliacrilato (PA) que apresenta elevada polaridade. Como alternativa, os recobrimentos mistos oferecem maior eficiência para os analitos polares e pouco polares, sendo seu uso adequado para uma gama de compostos de diferentes polaridades e volatilidades.¹⁰

2.3.1.2 Adição de sal

O pH do meio e a presença de eletrólitos fortes em amostras pode afetar a posição dos equilíbrios. A adição de eletrólitos como NaCl ou KNO₃ pode resultar no efeito *salting out*: cátions e ânions inertes que estejam presentes na solução podem causar uma diminuição da atividade do solvente e aumentar a atividade dos solutos. Este efeito é muito perceptível no caso de analitos polares e com baixa ou nenhuma contribuição no caso de moléculas apolares. O efeito *salting out* contribui para a determinação de analitos polares, pois o sal adicionado resultará em uma interação mais favorável dele com o solvente do que do solvente com os analitos, que por

essa razão estarão menos solúveis no solvente e por isso sua extração é facilitada. No caso de analitos apolares, a influência deste efeito não é significativa pois o sal não terá interação favorável com os mesmos.¹⁰ A polaridade dos analitos estudados pode ser verificada com base nos valores de log P expostos na Tabela 1. Estes valores estão relacionados com o coeficiente de partição de uma substância entre octanol e água (Kow), na qual mede a hidrofobicidade. Se $\log P < 0$ então a substância tende a solubilizar mais facilmente na fase aquosa, e quando $\log P > 0$ então a substância tende a se solubilizar mais facilmente na fase orgânica. Diante do exposto, considera-se que, quanto maior o valor de log P maior o caráter hidrofóbico.²⁴

2.3.1.3 Seleção do modo de extração

Em relação ao modo extração, que pode ser direta ou por *headspace*, sempre que possível é preferível que se escolha o modo *headspace*. Além da extração ser eficiente, pelo *headspace* a fibra não fica em contato direto com a amostra e conseqüentemente há uma preservação maior da mesma. Essas considerações são especialmente úteis no caso de amostras biológicas e ambientais, por exemplo, que por possuírem matrizes complexas, podem apresentar condições agressivas à fibra, que pode sofrer interferentes de maneira definitiva de modo que não será mais possível sua utilização.¹⁰

Extrações por imersão direta são recomendáveis no caso de analitos cuja pressão de vapor é baixa, ou seja, pouco voláteis, e por essa razão o equilíbrio é muito lento ou inatingível.¹⁰

2.3.1.4 Tempo de extração

Teoricamente, o tempo de extração é igual ou levemente superior ao tempo de equilíbrio, no qual a quantidade extraída é máxima em relação à concentração do analito na amostra. Porém na maioria dos casos, não é recomendável que se trabalhe nas condições de equilíbrio, pois este pode ser excessivo e tornar o procedimento prático inviável. Outra razão para tal é que após longos tempos de extração é possível que ocorra decréscimo nas massas extraídas, que, quando observado em qualquer tipo de recobrimento, é atribuído a difusão dos analitos

através do septo e tampa do frasco ou por adsorção sobre superfícies que estejam em contato com a amostra.¹⁰

2.3.1.5 Temperatura de extração

A temperatura de extração afeta a posição dos equilíbrios e a velocidade na qual o mesmo é atingido. Em relação à cinética, o aumento da temperatura e a velocidade na qual o equilíbrio é atingido são diretamente proporcionais, porém, em relação à posição do mesmo há mais fatores envolvidos: o aumento da temperatura favorece a transferência dos analitos da amostra para o *headspace*, porém, diminui a transferência do analito do *headspace* para a fibra. O efeito da temperatura é de difícil previsão e por isso este é um parâmetro que exige que sua otimização seja feita experimentalmente.¹⁰

2.3.1.6 Agitação da amostra

Considerando-se um sistema sem agitação, os processos de transferência de massa ocorrem quase que exclusivamente por difusão, no qual as moléculas de analito que estão na amostra se difundem através dela até atingirem a interface com o recobrimento da fibra, ou *headspace*, atravessam a mesma e migram para a outra fase também através da difusão. Ao incluirmos agitação na amostra e no *headspace*, acelera-se o processo de extração, visto que agora o transporte de moléculas do analito da amostra e do *headspace* para as respectivas interfaces do sistema ocorre, além da difusão, por convecção, que é mais rápido.¹⁰

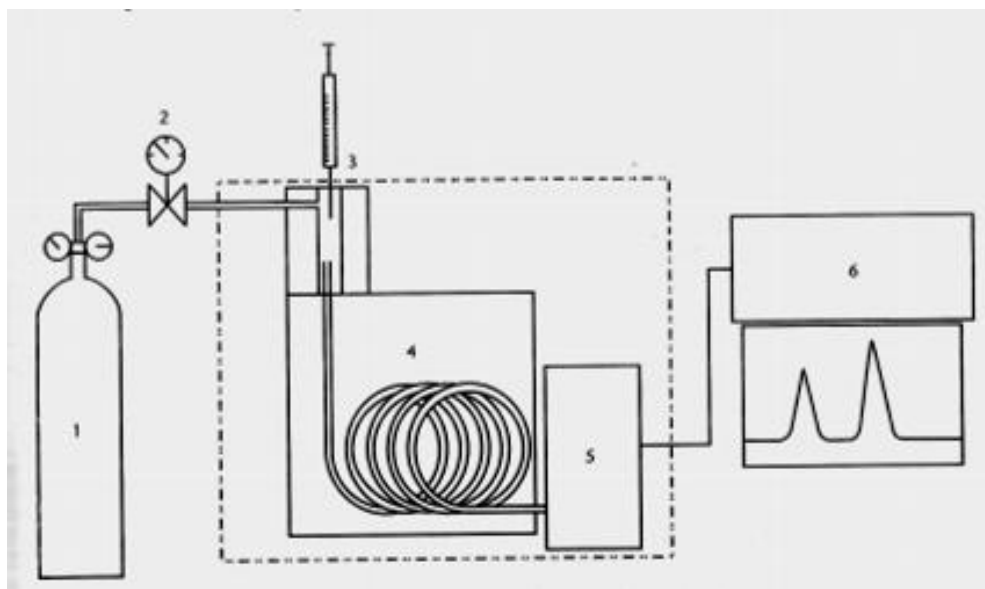
2.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Uma das técnicas mais empregadas em química analítica a fim de determinar espécies no âmbito qualitativo e quantitativo é a cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*). Neste tipo de análise, os componentes de uma amostra vaporizada são injetados no instrumento e são arrastados por uma fase móvel gasosa inerte através da coluna cromatográfica, na qual são separados conforme seus pontos de ebulição e suas interações com a fase estacionária líquida ou sólida presente no interior da coluna.²⁵

Os principais componentes de um cromatógrafo gasoso, ilustrado na Figura 4, são o sistema de gás de arraste e de injeção, forno, coluna e detector. Este último tem como função a detecção dos analitos e a conversão em um sinal eletrônico que irá resultar em um cromatograma. Existem vários tipos de detectores disponíveis no mercado, sendo um deles o espectrômetro de massas, que foi utilizado para as análises nesse trabalho. A combinação das duas técnicas recebe o nome de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, de sigla GC-MS (do inglês, *Gas Chromatography Mass Spectrometry*).²⁵

Após a separação dos componentes da amostra no cromatógrafo, a amostra é transferida para o espectrômetro de massas com o auxílio de um complexo sistema de vácuo que mantém a pressão baixa durante essa transição. Já no MS, ocorre a ionização das moléculas por ionização por elétrons com um determinado valor de energia suficiente para ionizar as ligações químicas das moléculas. Os íons são detectados e selecionados de acordo com a razão m/z (massa/carga) que produziram e geram um espectro contendo também a intensidade dos sinais.²⁵

Figura 4. Esquema básico de um cromatógrafo gasoso, sendo: 1) Fonte de gás de arraste; 2) controlador de vazão e regulador de pressão; 3) sistema de injeção da amostra; 4) coluna cromatográfica; 5) sistema de detecção; 6) sistema de registro e tratamento de dados.



Fonte: COLLINS (2006).²⁶

A análise via GC-MS é frequentemente utilizada por gerar resultados confiáveis e ser uma técnica eficiente para separação e identificação de compostos

em uma mistura. É útil especialmente para análise de compostos voláteis e semi-voláteis, fornecendo seus respectivos espectros de massas, os quais auxiliam na obtenção das possíveis estruturas dos compostos bem como suas respectivas massas moleculares. Na etapa de quantificação são avaliadas as áreas dos picos cromatográficos correspondentes a cada um dos compostos, já para a identificação dos analitos pode ser consultada uma biblioteca contendo diversos espectros de massas de moléculas já conhecidas, sendo NIST um exemplo desse tipo de biblioteca, ou ainda, através do índice de retenção de Kováts, o qual é utilizado devido à presença de estruturas semelhantes na amostra e que permite uma identificação das mesmas.²⁷

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O principal objetivo do trabalho consiste no desenvolvimento de um método eficiente de preparo de amostra para a extração de agrotóxicos organoclorados em amostras de água destinadas ao consumo humano através da técnica de microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) como técnica de separação e identificação dos compostos de interesse.

3.2 Objetivos específicos

- Otimizar a separação e a detecção dos compostos no GC-ECD, tais como o modo de injeção, a temperatura inicial do injetor, o tempo de dessorção térmica da fibra de SPME, o fluxo de gás, o programa de temperatura do forno e a temperatura do detector e da interface;
- Otimizar os parâmetros da técnica de SPME para a extração dos agrotóxicos organoclorados em água, tais como o recobrimento da fibra, o tempo de extração, a temperatura de extração e a adição de sal;
- Determinar os parâmetros de mérito da metodologia no GC-MS, tais como a faixa linear de trabalho, o coeficiente de determinação, os limites de detecção e de quantificação, a exatidão, a precisão intra-dia e inter-dia e a robustez do método;
- Aplicar a metodologia desenvolvida em análise de amostras coletadas em estações de tratamento de água de diferentes cidades catarinenses.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais e reagentes

Nesse trabalho foram utilizadas soluções padrão contendo os analitos de interesse preparada a partir de padrões adquiridos da Supelco (Bellefonte, PA, EUA) em metanol (J.T. Baker) com concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e padrão analítico de cloreto de sódio (Vetec) para a otimização da força iônica. Além disso, foram utilizadas fibras de SPME comerciais com diferentes recobrimentos (DVB/Car/PDMS, PDMS/DVB e PDMS) adquiridas da Supelco (Bellefonte, PA, EUA), frascos de vidro com tampa e septo para as extrações, barra de agitação magnética, um banho termostático (Lab Companion RW 0525G), um agitador magnético (DIST) e água ultrapura produzida por um aparelho *Mega purity* modelo MEGA RO/UP.

4.2 Amostras

Inicialmente, foram realizados ensaios de otimização da técnica de SPME com amostras de água ultrapura na qual os analitos foram adicionados a essas amostras em uma determinada concentração. Posteriormente, para a realização da curva de calibração, validação e aplicação da metodologia foram utilizadas amostras de água de estação de tratamento de água das cidades catarinenses de Taió, Campos Novos, Ituporanga, Videira e Balneário Camboriú.

As amostras das estações de tratamento de água foram coletadas em frascos âmbar de 2 L de capacidade previamente limpos através de um procedimento padrão de limpeza destes frascos coletores. O procedimento padrão de limpeza consiste em lavagem da vidraria primeiramente com água da torneira, seguida de lavagem com água de osmose reversa e em seguida com água ultrapura. Então, as vidrarias são deixadas em um banho de Extran a 5% por cerca de 48 horas e repete-se o procedimento de lavagem citado anteriormente e as vidrarias são deixadas na estufa para secagem a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após as coletas, as amostras ficaram armazenadas sob refrigeração a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

4.3 Instrumentação e condições cromatográficas

As análises cromatográficas na etapa de otimização da técnica de SPME foram realizadas em um cromatógrafo gasoso da Shimadzu modelo GC-14B com sistema de injeção *split/splitless* acoplado a um detector de captura de elétrons. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna da Agilent HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm de espessura do filme) e o gás de arraste foi nitrogênio ultrapuro com fluxo constante de 1 mL/min. A temperatura do injetor foi 260 °C e a temperatura inicial da coluna foi 100 °C mantida por 1 min, depois a temperatura foi aumentada até 180 °C na taxa de 10 °C/min e após atingida essa temperatura foi aumentada novamente até 260 °C na taxa de 3 °C/min, totalizando 30 min de corrida cromatográfica. O tempo de dessorção térmica da fibra no injetor do cromatógrafo foi fixado em 7 min.

A obtenção das curvas de calibração e a validação da metodologia foi realizada em um cromatógrafo gasoso com sistema de injeção *split/splitless* acoplado à espectrometria de massas da Shimadzu e modelo GC-MS-QP 2010 Plus. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas utilizadas no GC-ECD descritas anteriormente. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por elétrons em 70 eV. A temperatura da fonte de íons foi fixada em 230 °C e da interface em 280 °C, sendo o tempo de corte do solvente de 15 min. As figuras analíticas de mérito, bem como as análises das amostras foram realizadas em modo SIM (monitoramento de íon selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*), onde foram selecionadas 5 razões massa/carga de cada analito para a identificação e o íon majoritário (pico base) para a quantificação conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Informações dos íons em relação às razões massa/carga dos analitos.

Analito	Íons majoritários para a identificação (m/z)	Íon usado na quantificação (m/z)
Lindano	181, 183, 109, 219, 111	181
Aldrin	66, 263, 79, 91, 101	66
Clordano	375, 373, 377, 237, 371	375
α -endosulfan	241, 318, 248, 316, 320	241
DDE	246, 318, 248, 316, 320	246
Dieldrin	79, 81, 82, 77, 263	79
Endrin	81, 79, 263, 67, 82	81
β -endosulfan	195, 241, 237, 239, 243	195
DDD	235, 237, 165, 236, 199	235
Endosulfan sulfato	387, 272, 274, 389, 385	387

Fonte: Autoria própria (2018).

4.4 Otimização dos parâmetros da técnica de SPME

A otimização dos principais parâmetros operacionais ao utilizar SPME como método de extração tem como objetivos minimizar o tempo de operação, manipulação da amostra, consumo de reagentes, bem como maximizar a seletividade e sensibilidade.

Para a otimização dos parâmetros que afetam a eficiência de extração da técnica de SPME utilizou-se amostras de água ultrapura contendo os analitos em uma concentração conhecida. O procedimento prático de extração consistiu na preparação da solução em um frasco de 23 mL fechado com uma tampa contendo um septo para a inserção da fibra de SPME. O frasco foi imerso em um banho termostaticado e após a imersão do frasco no banho, com a fibra ainda retraída o septo foi perfurado pela agulha, que ao entrar em contato com a solução tem sua fibra exposta para a realização da extração por um determinado período de tempo. Em seguida, a fibra foi retraída e levada até o injetor do cromatógrafo para a dessorção térmica.

O modo de extração selecionado para esse estudo foi o modo imersão direta (DI-SPME) devido à baixa volatilidade dos agrotóxicos organoclorados estudados. No modo direto de extração, os analitos são transportados diretamente da amostra

para a fase extratora. Assim para facilitar uma extração mais rápida, algum nível de agitação é necessário para transportar os analitos da solução para a vizinhança da fibra. Assim, todas as extrações foram realizadas com agitação magnética constante de 1000 rpm.

4.4.1 Otimização da escolha do recobrimento da fibra de SPME

Para essa otimização foram utilizadas três fibras disponíveis comercialmente constituídas de DVB/Car/PDMS com 2 cm de comprimento e espessura de 50/30 μm , PDMS/DVB com 1 cm de comprimento e espessura de 65 μm e apenas PDMS com 1 cm de comprimento e espessura de 100 μm . Esse experimento foi realizado em triplicata com cada fibra sob as seguintes condições de extração: 23 mL de solução contendo 100 ng L⁻¹ dos analitos em água ultrapura a 60 °C durante 45 minutos de extração e sem a adição de sal.

4.4.2 Otimização do tempo e temperatura de extração e porcentagem de sal

Nessa otimização utilizou-se a fibra comercial DVB/Car/PDMS na qual os parâmetros de temperatura de extração variaram de 20 a 80 °C, o tempo de extração de 30 a 120 min e a concentração de cloreto de sódio de 0 a 30% (m/v). Esses parâmetros foram investigados simultaneamente através de um planejamento do composto central, totalizando 17 experimentos, incluindo uma triplicata no ponto central, conforme apresentado na Tabela 3. As extrações foram realizadas utilizando amostras contendo 100 ng L⁻¹ dos analitos em água ultrapura.

Tabela 3. Planejamento composto central empregado para otimização da extração de pesticidas organoclorados por DI-SPME utilizando a fibra DVB/Car/PDMS.

Experimento	Temperatura (°C)	Tempo (min)	NaCl (% m/v)
1	30	50	6
2	30	50	24
3	30	100	6
4	30	100	24
5	68	50	6
6	68	50	24
7	68	100	6
8	68	100	24
9 (ponto central)	49	75	15
10	20	75	15
11	80	75	15
12	49	30	15
13	49	120	15
14	49	75	0
15	49	75	30
16 (ponto central)	49	75	15
17 (ponto central)	49	75	15

Fonte: Autoria própria (2018).

4.5 Validação da metodologia desenvolvida

O método proposto nesse trabalho foi validado a partir da obtenção de curvas de calibração para cada analito na matriz aquosa da estação de tratamento da cidade de Taió utilizando as condições otimizadas da etapa de preparo de amostra. Para a obtenção das curvas de calibração foi utilizado 23 mL de amostra de água proveniente da estação de tratamento de água da cidade de Taió. As curvas de calibração para cada analito foram obtidas com 5 níveis de concentração realizados em triplicata. A partir das curvas de calibração obteve-se os seguintes parâmetros de mérito: faixa linear de trabalho, coeficiente de determinação (r^2), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para cada analito. Os valores do LOQ foram

obtidos através do primeiro ponto da curva de calibração de cada analito e os valores do LOD representam o valor de LOQ dividido por 3,3.

Ensaio de recuperação em três níveis diferentes de fortificação para cada analito foram realizados em amostras de água da estação de tratamento da cidade de Campos Novos para a avaliação da precisão e da exatidão do método desenvolvido nesse trabalho. A exatidão foi avaliada em termos de recuperação, sendo aceitos valores na faixa de 60 a 120%.²⁸ A precisão foi avaliada através dos valores de desvio padrão relativo (RSD), sendo aceitos valores menores que 20%. A precisão intra-dia foi avaliada em três níveis diferentes de fortificação e no mesmo dia. Já a precisão inter-dia foi avaliada em apenas um nível de fortificação e em 3 dias diferentes.

4.6 Programas utilizados na análise dos dados

Para a análise dos dados que foram gerados nos experimentos de otimização e da validação do método desenvolvido nesse trabalho foram utilizados os seguintes programas: Microsoft Excel 2016 e STATISTICA 8.0.

4.7 Segurança e tratamento de resíduos

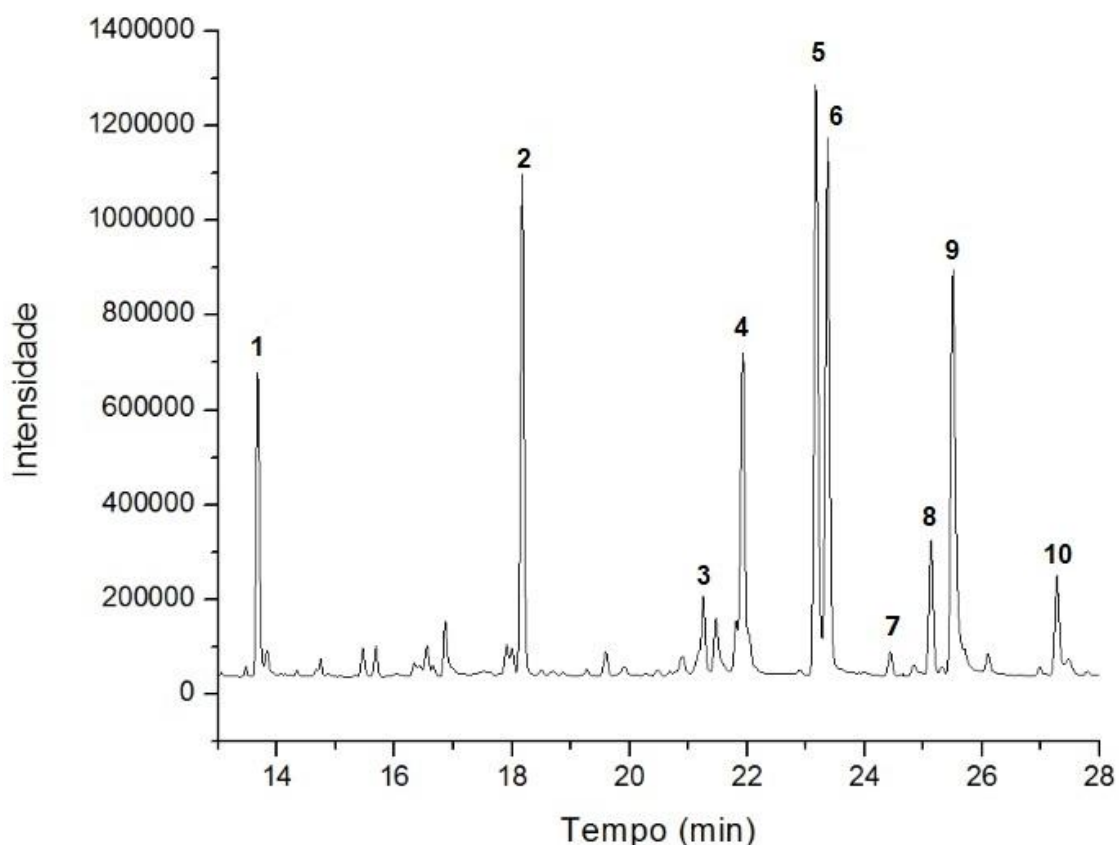
Nesse trabalho manipulou-se amostras contendo compostos organoclorados, ou seja, é importante que se tenha muito cuidado na manipulação dos mesmos visto que podem causar sérios danos à saúde, por isso atentou-se ao uso dos equipamentos de segurança disponíveis e ao descarte correto das soluções geradas. Como a técnica de extração utilizada nesse trabalho tem como uma de suas características o pouco ou nenhum uso de solventes, a baixa quantidade de resíduo gerada foi descartada em um recipiente específico no laboratório e posteriormente tratado por uma empresa credenciada na UFSC.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização da separação cromatográfica

A separação e identificação dos compostos foram realizadas primeiramente no GC-ECD tomando como base o trabalho de CARMO *et al.*²⁹, na qual foi realizado todas as otimizações da técnica de SPME nesse equipamento. A partir disso, para a validação e aplicação do método, as mesmas condições cromatográficas foram inseridas no GC-MS e foi possível obter o cromatograma da separação demonstrado na Figura 5, na qual os tempos de retenção de cada analito estão mostrados na Tabela 4.

Figura 5. Cromatograma da separação cromatográfica obtido no GC-MS no modo SCAN com a injeção de 1 μL da mistura de padrões de concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ no modo *splitless*.



Legenda: 1- Lindano (13,6 min); 2 –Aldrin (18,2 min); 3- Clordano (21,2 min); 4- α -endosulfan (21,9 min); 5 – 4,4-DDE (23,1 min); 6- Dieldrin (23,3 min); 7- Endrin (24,4 min); 8- β -endosulfan (25,1 min); 9 – 4,4-DDD (25,5 min); 10- Endosulfan sulfato (27,3 min).

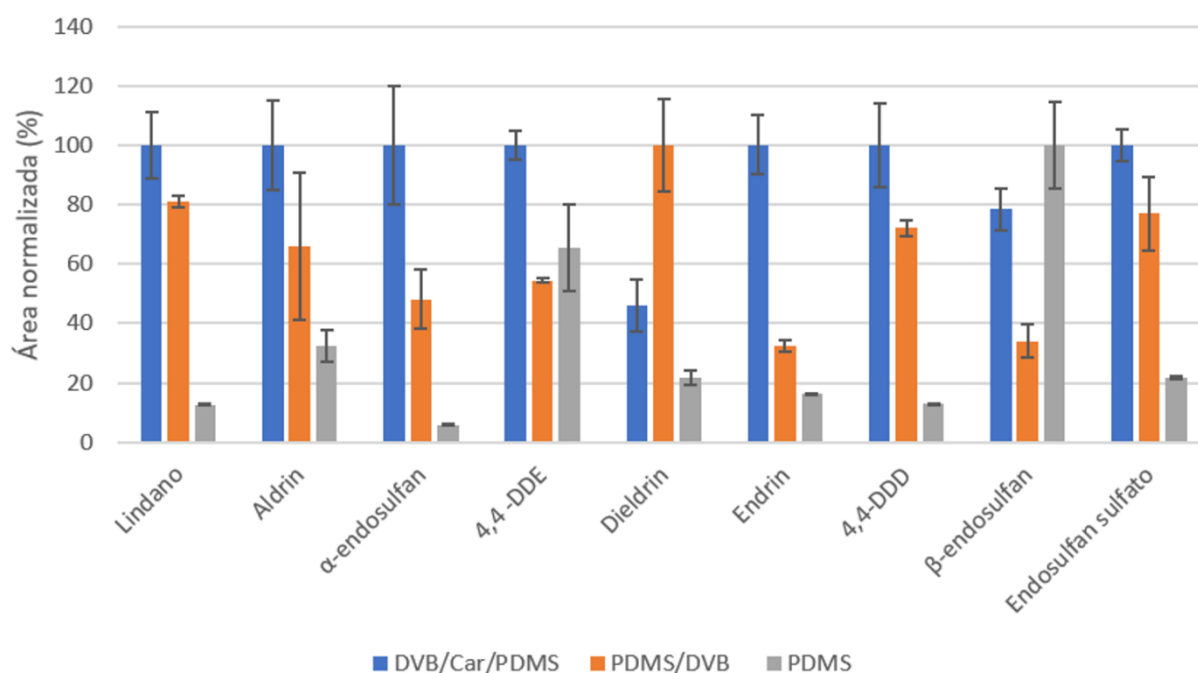
Fonte: Autoria própria (2018).

5.2 Otimização dos parâmetros de extração da técnica de SPME

5.2.1 Recobrimento da fibra

Nesse experimento avaliou-se a eficiência de extração de três fibras comerciais diferentes e a Figura 6 representa graficamente o resultado obtido para essa otimização. Pode-se verificar que a fibra tripla de DVB/Car/PDMS obteve respostas maiores em 7 dos 9 analitos testados e para outro analito mostrou-se similar considerando-se a barra de erro. Sendo assim, o recobrimento misto de DVB/Car/PDMS foi escolhido para as próximas etapas do trabalho já que possui um caráter misto e consequentemente abrange compostos de polaridades variadas.

Figura 6. Gráfico da otimização da escolha do recobrimento da fibra.



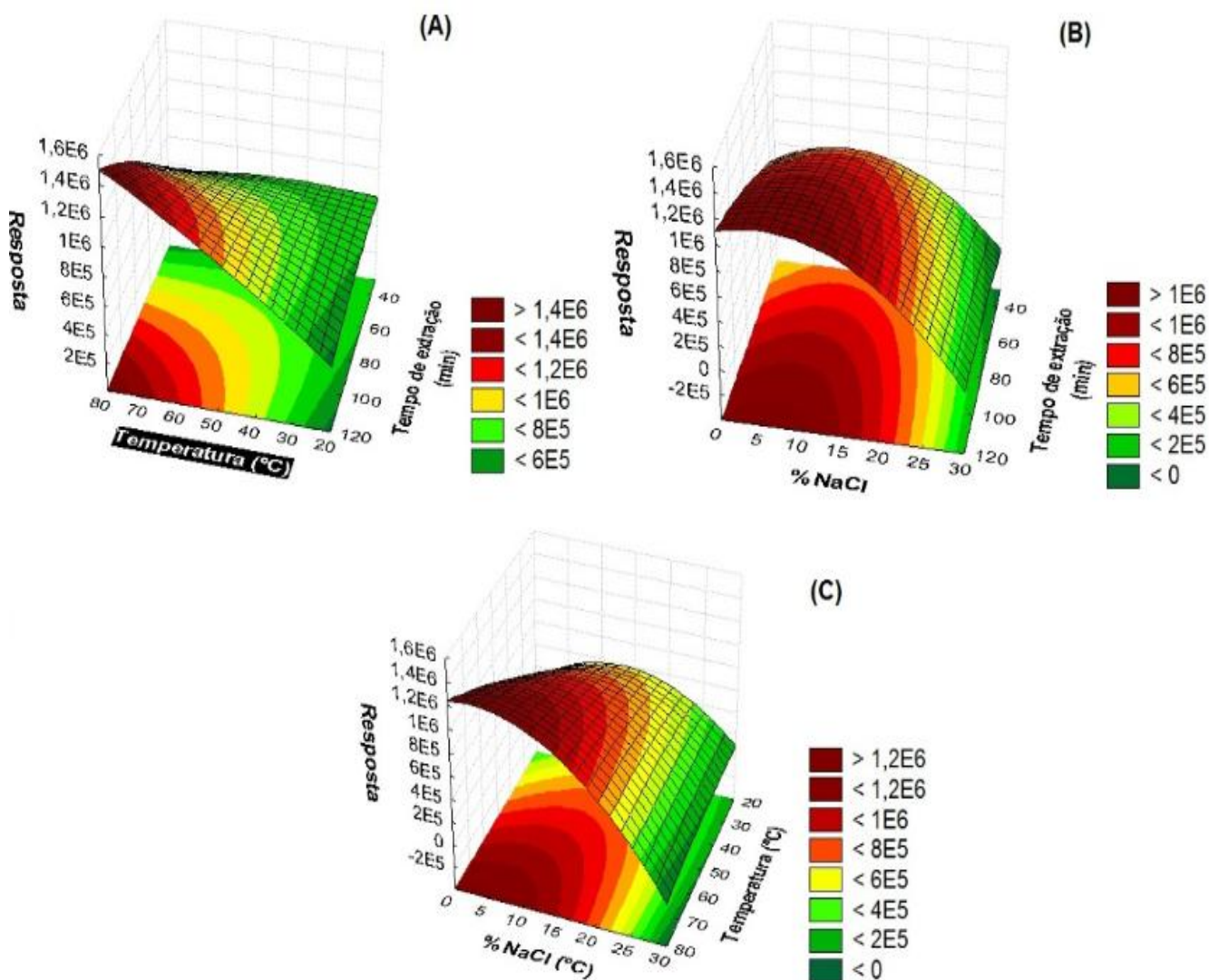
Fonte: Autoria própria (2018).

5.2.2 Adição de sal, temperatura e tempo de extração

Essa otimização foi realizada de maneira multivariada através do planejamento composto central com 17 experimentos e o resultado obtido dessa otimização está demonstrado na Figura 7.

Figura 7. Superfícies de resposta obtidas na extração de agrotóxicos organoclorados por DI-SPME com a fibra DVB/Car/PDMS. (A) tempo de extração

versus temperatura. (B) temperatura versus % de NaCl. (C) Tempo de extração versus % de NaCl



Fonte: Autoria própria (2018).

A partir das superfícies resposta obtidas, é possível afirmar que as melhores condições que visam a máxima eficiência de extração são: sem adição de NaCl, 80 min de extração sob a temperatura de 70 °C. A equação quadrática gerada no planejamento composto central pelo Statistica 8.0 apresentou coeficiente de determinação igual a 0,8995 conforme demonstrado na tabela ANOVA da Figura 8, o que demonstra uma boa correlação entre os resultados preditos e os obtidos através dos experimentos.

Figura 8. Tabela ANOVA obtida para o planejamento composto central.

ANOVA; Var.:Resposta; R-sqr=.89948; Adj.:77024 (Spreadsheet4) 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=228359E5 DV: Resposta					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Temperatura (°C)(L)	3,488351E+11	1	3,488351E+11	15,27577	0,005835
Temperatura (°C)(Q)	1,757843E+10	1	1,757843E+10	0,76977	0,409387
(2)Tempo (min)(L)	1,457288E+11	1	1,457288E+11	6,38158	0,039453
Tempo (min)(Q)	1,359832E+10	1	1,359832E+10	0,59548	0,465555
(3)% NaCl(m/v)(L)	6,663895E+11	1	6,663895E+11	29,18172	0,001006
% NaCl(m/v)(Q)	1,721632E+11	1	1,721632E+11	7,53916	0,028679
1L by 2L	6,764080E+10	1	6,764080E+10	2,96204	0,128918
1L by 3L	2,374985E+10	1	2,374985E+10	1,04002	0,341761
2L by 3L	9,703755E+09	1	9,703755E+09	0,42494	0,535294
Error	1,598510E+11	7	2,283585E+10		
Total SS	1,590231E+12	16			

Fonte: Autoria própria (2018).

A não influência da adição de sal na eficiência de extração pode ser justificada pela polaridade dos analitos, já que são compostos de baixa polaridade, não sendo verificado então o efeito *salting out* que acontece principalmente na extração de compostos polares, na qual a adição de sal diminui a solubilidade dos analitos em água e faz com que aumente a afinidade deles pela fase extratora, aumentando assim consequentemente a eficiência de extração.¹⁰

Em relação ao tempo da extração, teoricamente, levaria um tempo infinito para que o equilíbrio fosse atingido, porém como essa situação é inviável na prática, assume-se que o tempo de equilíbrio é aquele necessário para que seja extraída 95% da quantidade máxima prevista em teoria após um tempo supostamente infinito de extração. Tratamentos matemáticos consideram que o tempo necessário para que se alcance o equilíbrio é diretamente proporcional ao quadrado da espessura do filme de recobrimento da fibra, ou seja, quando mais espesso este for, mais tempo levará para se atingir o equilíbrio, e inversamente proporcional ao coeficiente de difusão do analito na fase do qual está sendo sorvido.¹⁰

Considerando o exposto na Figura 7 é possível perceber que, a região de que demarca o tempo apresenta condições favoráveis em até 120min de extração. Porém, não necessariamente, o equilíbrio é atingido e por essa razão, pode-se trabalhar em condições de pré-equilíbrio se a sensibilidade obtida estiver de acordo com o objetivo proposto. Além disso, em temperaturas altas, a difusão dos analitos da matriz para a fibra é favorecida, e como consequência, tempos menores podem ser escolhidos para o procedimento.³⁰

Por fim, na Tabela 5 estão demonstrados de maneira resumida os resultados obtidos na otimização cromatográfica e da otimização da técnica de SPME.

Tabela 5. Dados de operação do GC-MS e resultados da otimização dos parâmetros da SPME.

Parâmetro	Condição definida
Recobrimento da fibra de SPME	DVB/Car/PDMS
Modo de extração com SPME	Imersão Direta
Volume da amostra	23 mL
Agitação	1000 rpm
Temperatura de extração	70 °C
Tempo de extração	80 min
Tempo de dessorção térmica	7 min
Temperatura do injetor	260°C
Temperatura do detector	280°C
Tempo da corrida	29 min
Fluxo de gás de arraste	1 mL/min

Fonte: Autoria própria (2018).

5.3 Validação da metodologia

A validação de um método analítico tem como objetivo assegurar que a metodologia empregada seja exata, precisa reprodutível e flexível numa faixa específica da substância em análise. É preciso garantir que o método reproduza valores consistentes com os de referência, e se suas características estiverem de acordo com os requisitos estabelecidos, considera-se que o método foi validado.³¹

A validação dos métodos propostos pelas empresas e laboratórios é de responsabilidade de órgãos reguladores, como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia).³¹

A ANVISA, juntamente com o Ministério da Saúde, através da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166 de 24 de julho de 2017 dispõe sobre a validação

de métodos analíticos e reúne, no capítulo IV, os parâmetros de validação analítica. São eles: seletividade, linearidade, efeito matriz, faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.³²

Sendo assim, a metodologia desenvolvida nesse trabalho foi validada “*in-house*” seguindo alguns parâmetros. Primeiramente, foi obtido curvas de calibração com 5 níveis de concentração variando de 20 a 400 ng L⁻¹ dos analitos em triplicata em água ultrapura sendo os resultados demonstrados na Tabela 6. Em sequência, obteve-se curvas de calibração com 5 níveis de concentração, mas agora na matriz aquosa proveniente da estação de tratamento de água da cidade de Taió e os dados obtidos das curvas de calibração também estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6. Comparação entre as equações da reta gerados a partir das curvas de calibração realizadas em água ultrapura e na matriz aquosa.

Analito	Equação da reta da curva de calibração em água ultrapura	Equação da reta da curva de calibração na matriz aquosa
Lindano	$y = 412,43x - 6954,2$	$y = 207,2x + 704,6$
Aldrin	$y = 511,72x + 3024,2$	$y = 324,1x - 4539,7$
Clordano	$y = 102,23x - 459,24$	$y = 68,54x - 1306,2$
α -endosulfan	$y = 223,04x - 4352,1$	$y = 244,75x + 3739,9$
4,4-DDE	$y = 1360,9x - 41572$	$y = 742,98x - 5444,4$
Dieldrin	$y = 3486,5x - 62927$	$y = 1370,2x + 28897$
Endrin	$y = 705,49x - 19784$	$y = 185,44x - 1013,2$
β -endosulfan	$y = 100,59x - 18,51$	$y = 164,61x + 3609,3$
4,4-DDD	$y = 1323,8x - 44546$	$y = 493,32x - 1934,2$
Endosulfan sulfato	$y = 45,749x - 653,29$	$y = 10,843x - 65,146$

Fonte: Autoria própria (2018).

A partir das informações contidas na Tabela 6 é possível afirmar que existe a presença de efeito de matriz, pois os coeficientes angulares das equações de reta diferem entre aquele obtido na água ultrapura e na matriz aquosa, sendo os

coeficientes angulares maiores em água ultrapura para a maioria dos analitos com exceção do β -endossulfan, o que sugere uma maior sensibilidade do método em água ultrapura do que na matriz aquosa proveniente de estação de tratamento de água.

O efeito de matriz pode ser descrito também como o aumento da resposta cromatográfica induzida pela matriz. É usado para explicar as taxas de recuperação de agrotóxicos que excederem 100% e a baixa precisão de resultados.³³ Na Tabela 7 abaixo são apresentados alguns exemplos de resultados de análises de agrotóxicos com taxas de recuperação superiores a 100%.

Tabela 7. Porcentagens de recuperação superiores a 100% para alguns agrotóxicos em diferentes matrizes

Agrotóxicos	Matrizes	% Rec.	Ref.
Captan	Mel	1028	34
Clorotalonil	Tomate	253	35
Fluvalinato	Sucos	403	36
Cipermetrina	Espinafre	147	37
DDT	Plantas medicinais	124	38
Deltametrina	Alface	133	39

Fonte: PINHO *et al.*⁴⁰

Outras consequências do efeito de matriz podem ser: resultado falso negativo gerado pelo “mascaramento” do pico de interesse que pode ocorrer devido à perda de analito no processo de injeção, resultando em baixas respostas e dificuldade para integração;³⁵ falso positivo através de identificação de analitos prejudicada pois componentes da matriz podem ser “confundidos” com o mesmo (ao usar um detector do tipo MS esse problema pode ser corrigido);^{35,36} superestimação ou subestimação do resultado causados, respectivamente, pela presença de impurezas voláteis sendo eluídas no mesmo tempo de retenção dos analitos e extinção do sinal do detector diminuindo o sinal do analito.³⁷

Segundo proposto por PINHO *et al.*⁴⁰ os problemas gerados pelo efeito de matriz devem ser estudados e minimizados sempre que possível, inclusive para permitir a quantificação exata de agrotóxicos em amostras ambientais. Vários

métodos são discutidos na literatura, porém não se pode considerar nenhum deles totalmente eficaz levando em conta a diversidade de analitos e matrizes. Portanto, entende-se que a escolha do método afim adequado para reduzir o efeito de matriz depende de vários fatores: analitos, método analítico, condições do equipamento, tempo disponível, quantidade de amostras, recursos, etc.⁴⁰

Portanto, observado esse efeito de matriz na obtenção das curvas de calibração, optou-se pela calibração na matriz aquosa proveniente da estação de tratamento de água invés da calibração externa com água ultrapura. Sendo assim, a Tabela 8 demonstra as equações de reta, a faixa linear de trabalho, o coeficiente de determinação e os limites de detecção e quantificação obtidos através das curvas de calibração na matriz aquosa da estação de tratamento da cidade de Taió.

Tabela 8. Equação da reta, faixa linear de trabalho, coeficiente de determinação, limite de detecção e de quantificação para os analitos estudados nesse trabalho.

Analito	Equação da reta	Faixa linear de trabalho (ng L ⁻¹)	r ²	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)
Lindano	$y = 207,2x + 704,6$	20-400	0,9952	6	20
Aldrin	$y = 324,1x - 4539,7$	20-400	0,9939	6	20
Clordano	$y = 68,54x - 1306,2$	20-400	0,9926	6	20
α -endosulfan	$y = 244,75x + 3739,9$	20-400	0,9938	6	20
4,4-DDE	$y = 742,98x - 5444,4$	20-400	0,9925	6	20
Dieldrin	$y = 1370,2x + 28897$	20-400	0,9930	6	20
Endrin	$y = 185,44x - 1013,2$	20-400	0,9938	6	20
β -endosulfan	$y = 164,61x + 3609,3$	20-400	0,9928	6	20
4,4-DDD	$y = 493,32x - 1934,2$	20-400	0,9956	6	20
Endosulfan sulfato	$y = 10,843x - 65,146$	20-400	0,9973	6	20

Fonte: Autoria própria (2018).

A partir da Tabela 8 pode-se perceber que os valores do coeficiente de determinação obtidos para os analitos foram satisfatórios estando todos acima de 0,9925. Os valores de LOD obtidos para os analitos foram de 6 ng L⁻¹ e os valores de LOQ foram de 20 ng L⁻¹.

É importante ressaltar também que os limites atingidos com essa metodologia proposta alcançaram os limites estabelecidos na Portaria do Ministério da saúde nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011, que estabelece o valor máximo permitido (VMP) em água potável dos agrotóxicos organoclorados conforme apresentado pela Tabela 9.

Tabela 9. Agrotóxicos organoclorados em estudo e Valores Máximos Permitidos em água destinada para o consumo humano.

Agrotóxico organoclorado	VMP (ng L⁻¹)	LOQ do método proposto (ng L⁻¹)
Aldrin e Dieldrin	30	20
4,4-DDD, 4,4- DDE e clordano	1000	20
Endosulfan (α, β e sais)	20000	20
Endrin	600	20
Lindano	2000	20

Fonte: Portaria nº 2.914, Ministério da Saúde, 12 de dezembro de 2011.⁴¹

Para a avaliação da exatidão e da precisão do método desenvolvido foram realizados testes de recuperação com a adição de diferentes concentrações de analitos na amostra de água proveniente da estação de tratamento da cidade de Campos Novos na qual os resultados estão mostrados na Tabela 10. Os experimentos foram realizados em triplicata em cada nível de fortificação.

Tabela 10. Resultados obtidos através de ensaios de recuperação para a avaliação da exatidão e precisão do método desenvolvido.

Analito	Adicionado (ng L ⁻¹)	Recuperação (%) (n=3)	Precisão (RSD, %, n=3 e n=9)	
			Intra-dia	Inter-dia
Lindano	20	80	6,7	-
	200	112	5,4	11
	400	100	1,1	-
Aldrin	20	64	0,4	-
	200	57	2,5	9
	400	66	4,0	-
Clordano	20	100	7,9	-
	200	66	3,5	17
	400	115	11,8	-
α -endosulfan	20	117	17,9	-
	200	77	7,9	20
	400	122	5,2	-
4,4-DDE	20	103	12,5	-
	200	106	1,7	12
	400	68	8,8	-
Dieldrin	20	84	0,2	-
	200	119	13,2	11
	400	117	3,3	-
Endrin	20	109	6,1	-
	200	72	2,8	17
	400	67	3,8	-
β -endosulfan	20	69	15,2	-
	200	63	0,1	13
	400	78	4,5	-
4,4-DDD	20	77	10,2	-
	200	122	2,3	20
	400	62	5,1	-
Endosulfan sulfato	20	100	18,0	-
	200	79	18,5	16
	400	67	1,2	-

Fonte: Autoria própria (2018).

Conforme a Tabela 10, pode-se perceber que a recuperação variou de 57 a 122%, o que está de acordo com a faixa estabelecida de recuperação para métodos que utilizam microextração em níveis de parte por trilhão (ppt). A faixa de precisão intra-dia variou de 0,1 a 18,5% e a de inter-dia de 9 a 20%, o que está de acordo também para os valores de precisão que devem ser menores que 20%.²⁸ Sendo assim, o método desenvolvido nesse trabalho mostrou-se válido para a faixa linear

de trabalho utilizada para todos os analitos estudados. Em relação à robustez do método proposto, a mesma foi avaliada a partir de pequenas variações de 6 parâmetros envolvidos na metodologia: temperatura de extração, tempo de extração, tempo de dessorção, temperatura do injetor, velocidade de agitação e volume da amostra. A Tabela 11 traz uma relação dos parâmetros citados em suas condições nominais (definidas no processo de otimização) e a variação dos mesmos.

Tabela 11. Relação entre as condições nominais e variações dos parâmetros analisados para avaliação da robustez.

Parâmetro	Condição nominal		Variação	
Temperatura de extração	70 °C	A	72 °C	a
Tempo de extração	80 min	B	82 min	b
Tempo de dessorção	7 min	C	6 min	c
Temperatura do injetor	260 °C	D	262 °C	d
Velocidade de agitação	1000 rpm	E	900 rpm	e
Volume da amostra	23 mL	F	22,950 mL	f

Fonte: Autoria própria (2018).

A Tabela 12 a seguir traz a combinação dos parâmetros e suas respectivas variações para cada um dos 8 experimentos feitos no teste de robustez. O resultado é dado pela área geométrica dos picos cromatográficos de todos os analitos em cada experimento.

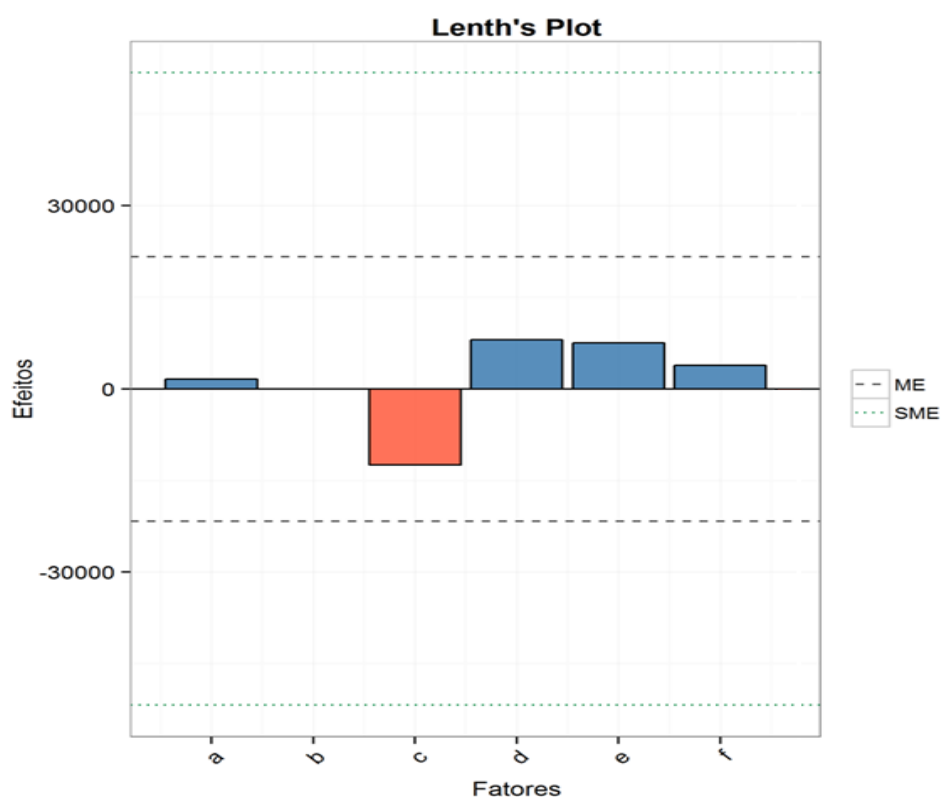
Tabela 12. Combinação dos parâmetros e suas variações nos experimentos realizados para avaliação da robustez.

Efeito	Combinação dos parâmetros							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	70 °C	70 °C	70 °C	70 °C	72 °C	72 °C	72 °C	72 °C
B/b	80 min	80 min	82 min	82 min	80 min	80 min	82 min	82 min
C/c	7 min	6 min	7 min	6 min	7 min	6 min	7 min	6 min
D/d	260 °C	260 °C	262 °C	262 °C	262 °C	262 °C	260 °C	260 °C
E/e	1000 rpm	900 rpm	1000 rpm	900 rpm	1000 rpm	900 rpm	1000 rpm	900 rpm
F/f	23,00 mL	22,95 mL	22,95 mL	23,00 mL	23,00 mL	22,95 mL	22,95 mL	23,00 mL
Resultado (área)	47487	36115	35618	44820	30790	46501	35011	58387

Fonte: Autoria própria (2018).

A Figura 9 a seguir expõe graficamente os resultados da análise de robustez.

Figura 9. Resultado gráfico obtido pela análise de robustez.



Fonte: Autoria própria (2018).

As áreas em azul indicam que o parâmetro variado proporcionou uma variação positiva em relação aos valores esperados, já a área em vermelho indica que na variação daquele parâmetro, os resultados obtidos foram menores do que o valor de referência. Visto que as duas áreas não ultrapassam as linhas tracejadas (superior a 30000 e inferior a -30000) considera-se que as variações resultantes das diferentes alterações nos valores nominais dos parâmetros são aceitáveis e não comprometem a aplicabilidade do método proposto, portanto, o mesmo pode ser considerado robusto.

5.4 Comparação da metodologia proposta com outros da literatura

O método desenvolvido nesse trabalho também foi comparado com outros métodos reportados na literatura na determinação de agrotóxicos organoclorados em água, conforme mostrado na Tabela 13.

Tabela 13. Valores de faixa linear, limite de quantificação e detecção encontrados na literatura para alguns dos analitos estudados em água.

Metodologia	Faixa linear (ng L ⁻¹)	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	Referência
SPME e GC-MS	20 - 400	6 ^{a-j}	20 ^{a-j}	Este trabalho
	5 - 50	1 ^{d-f}	3 ^{d-f}	
	5 - 50	0,5 ^e	1,5 ^e	
SPME e GC-MS	500 - 2500	50 ^g	170 ^g	42
	1700 - 8500	500 ^h	1700 ^h	
	3300 - 1600	1000 ^j	3300 ^j	
	10 - 1000	3 ^f	10 ^f	
SPME e GC-MS	50 - 300	15 ^g	50 ^g	43
	30 - 1000	9 ^a	30 ^a	
SPE e GC-ECD	1000 - 50000	300 ^{d,e,g,h}	1000 ^{d,e,g,h}	44
SPE e GC-MS e UHPLC-MS/MS	50000 - 500000	10 - 80 ^{b,g} 170 ^{b,g}	25 - 25000 ^{b,g} 500 ^{b,g}	45

^aLindano, ^bAldrin, ^cClordano, ^dα-endosulfan, ^e4,4-DDE, ^fDieldrin, ^gEndrin, ^hβ-endosulfan, ⁱ4,4-DDD, ^jEndosulfan sulfato.

Fonte: Autoria própria (2018).

Considerando a faixa linear deste trabalho de 20 a 400 ng L⁻¹, bem como os limites de quantificação e detecção, 6 e 20 ng L⁻¹ respectivamente, é possível concluir que, para a maioria dos analitos, os resultados gerados foram satisfatórios e semelhantes ao encontrado na literatura.

5.5 Aplicação da metodologia desenvolvida

Em relação as amostras analisadas das estações de tratamento de água das cidades catarinenses de Ituporanga, Videira e Balneário Camboriú, os analitos não estavam presentes nessas amostras ou suas concentrações estavam abaixo do limite de detecção da metodologia desenvolvida.

6 CONCLUSÕES

A metodologia proposta por esse trabalho para a extração de agrotóxicos organoclorados em amostras de água para consumo humano utilizando a SPME como técnica de extração no procedimento de preparo de amostra mostrou-se eficiente.

Em relação aos parâmetros de validação do método desenvolvido, os valores apresentados são aceitos pelas normas de validação, tais como coeficientes de determinação superiores a 0,9925 para todos os analitos estudados, os ensaios de recuperação apresentaram valores na faixa de 57 a 122%, a precisão intra-dia e inter-dia de foram menores que 20%.

Já os limites de quantificação alcançados pela metodologia proposta foram menores que os valores máximos permitidos pela legislação dos agrotóxicos em água para consumo humano e também foram semelhantes ou ainda menores que outros métodos reportados na literatura.

As amostras de água provenientes das estações de tratamento de água de cidades catarinenses analisadas através da metodologia proposta não apresentaram a presença dos analitos, ou seja, estão aptas para serem consumidas.

De maneira geral, o método desenvolvido pode ser utilizado na determinação de agrotóxicos organoclorados em amostras de água para consumo humano a fim de garantir a qualidade da água que todo cidadão tem o direito de receber em sua residência.

REFERÊNCIAS

1. BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. **A química dos agrotóxicos**. Química Nova na Escola, v. 34, n. 1, p. 10-15, fev. 2012.
2. **Portal ministério da saúde**. Disponível em <<http://portalms.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/vigilancia-ambiental/vigipeq/contaminantes-quimicos/agrotoxicos>>. Acesso em: 12 jun. 2018.
3. **Ministério do meio ambiente**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/convencao-de-estocolmo>>>. Acesso em: 14 nov. 2018.
4. **Portal da educação**. Disponível em <<https://www.portaleducacao.com.br/conteudo/artigos/farmacia/definicao-e-classificacao-dos-agrotoxicos/359>>. Acesso em: 12 jun. 2018.
5. **Portal tratamento de água**. Disponível em: <<https://www.tratamentodeagua.com.br/artigo/contaminacao-ambiental-por-agrotoxicos/>>. Acesso em: 13 jun. 2018.
6. HESS, S. (org). **Ensaio sobre a poluição e doenças no Brasil**. São Paulo, Ed. Outras Expressões, 2018. 344p.
7. **PPDB**. Pesticide Properties DataBase. Universidade de Hertfordshire. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>>. Acesso em: 13 jun. 2018.
8. **PubChem**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#>>. Acesso em: 13 jun. 2018.
9. **ChemSpider**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/>>. Acesso em: 13 jun. 2018.

10. FIGUEREIDO, E. C.; BORGES, K. B.; QUEIROZ, M. E. C. (orgs). **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Editora Gen LTC, Rio de Janeiro, 2015.
11. HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. Tradução da 7ª edição, Rio de Janeiro: Editora LTC, 2008. 867 p.
12. OENNING, A. L., **Desenvolvimento de metodologia para análises toxicológicas forenses na determinação de praguicidas em urina humana empregando a técnica de extração em ponteiras descartáveis e GC-MS**. 2018. 83 f. Dissertação (Mestrado em química). Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
13. DIAS, A.N. **Cortiça: uma nova abordagem como fase extratora para microextração em fase sólida e microextração em barra adsortiva**. 2015. 151 f. Tese (Doutorado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
14. PAWLISZYN, A. C. L. **Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers**. Analytical Chemistry, 1990. Vol. 62, p. 2145-2148.
15. LI, J., WANG, Y. B., LI, K. Y., CAO, Y. Q., WU, S., WU, L. **Advances in different configurations of solid-phase microextraction and their applications in food and environmental analysis**. Trends in Analytical Chemistry, 2015. Vol. 72, p. 141-152.
16. VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. **Microextração por fase sólida**. *Química Nova*, 2000, 23(4), 523-530.
17. MERIB, J. O. **Otimização e aplicação da microextração em fase sólida com e sem refrigeração interna em amostras de ervas medicinais e água de rio**. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC

18. FONSECA, D. B.; COELHO, G. L. V. **Determinação do coeficiente de atividade na diluição infinita através da microextração em fase sólida (SPME)**. Quím. Nova, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1606-1608, 2007.
19. QUINTEIRO, LEILA MARTINS DA COSTA *et al.* **Microextração em fase sólida: fundamentos e aplicações em análise de alimentos**. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, [S.l.], june 2003. ISSN 19839774. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/1145/946>>. Acesso em: 05 nov. 2018.
20. PAWLISZYN, J. **Solid Phase Microextraction: theory and practice**. NewYork: John Wiley & Sons, 1997. 247 p.
21. MENEZES FILHO, A. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologias para determinação de resíduos de agrotóxicos em manga por SPME-GC-MS e SPME-HPLC-UV-Vis**. 2010. 150 f. Tese (Doutorado em química). Programa de pós-graduação em química da Universidade Federal da Bahia.
22. SUCHARA, E.A. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de fármacos em fluidos biológicos e amostras ambientais por cromatografia líquida e gasosa**. 2007. 145 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.
23. BIANCHI, F., *et al.* (2007). **Fish and food safety: Determination of formaldehyde in 12 fish species by SPME extraction and GC-MS analysis**. Food Chemistry, 100(3), 1049–1053.
24. D'AGOSTINHO, A., FLUES, M. **Determinação do coeficiente de distribuição (K_d) de benzoapireno em solos por isotermas de sorção**. Química Nova, São Paulo, v.29, n.4, 657-661, 2006.

25. SKOOG, A.D., WEST, D.M., HOLLER, F.J., CROUCH, R.S. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana, São Paulo: Editora Thomson, 2006. 1104 p.
26. COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. (orgs). **Fundamentos de cromatografia**. 5º Ed. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2006. 456p.
27. MÜHLEN, C. V. **Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente**. Scientia Chromatographica, 3, 21-29, 2009.
28. Guidelines for Standard Method Performance Requirements. **AOAC Official Methods of Analysis**. Disponível em: <http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf>. Acesso em 05 dez. 2018.
29. DO CARMO, S. N.; **Determinação de agrotóxicos organoclorados em água para consumo humano usando SPME-GC/ECD**. Florianópolis: FAPESC, 2018. 16p.
30. OUYANG, G.; PAWLISZYN, J. **Recent developments in SPME for on-site analysis and monitoring**, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 25 (2006) 692-703.
31. **BRASIL ANVISA**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017. **Guia para validação de métodos analíticos** - Julho, 2017.
32. **Portal Action**. Disponível em:< <http://www.portalaction.com.br/validacao-de-metodologia-analitica>> Acesso em: 04 nov. 2018.
33. HAJŠLOVÁ, J. *et al*; **Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues**. *J. Chromatogr., A*.1998, 800, 283.
34. JIMENEZ, J. J. *et al*; **Gas chromatography with electron-capture and nitrogen–phosphorus detection in the analysis of pesticides in honey**

after elution from a Florisil column: Influence of the honey matrix on the quantitative results. Chromatogr., A 1998, 823, 381.

35. MENKISSOGLU-SPIROUDI,U.; FOTOPOULOU, A. **Matrix effect in gas chromatographic determination of insecticides and fungicides in vegetables.** Int. J. Environ. Anal. Chem. 2004, 84, 15.
36. SANCHEZ-BRUNETE, C; *et al.*; **Determination of pesticide residues by GC-MS using analyte protectants to counteract the matrix effect.** Anal. Sci. 2005, 21, 1291.
37. SHIMELIS, O. *et al.* **Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis.** J. Chromatogr., A 2007, 1165, 18.
38. RODRIGUES, M. V. N. *et al.*; **GC-MS determination of organochlorine pesticides in medicinal plants harvested in Brazil.** J. Braz. Chem. Soc., São Paulo , v. 18, n. 1, p. 135-142, 2007 .
39. GONZALEZ-RODRIGUEZ, R. M. *et al.*; **Occurrence of fungicide and insecticide residues in trade samples of leafy vegetables,** J.; Food Chem. 2008, 107, 1342.
40. PINHO, Gevany P. *et al.* **Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa.** Quím. Nova, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009.
41. **Portaria nº 2.914, Ministério da Saúde.** Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html> Acesso em: 13 nov. 2018.
42. PRATES, C.B. *et al.* **Análise de pesticidas organoclorados em água utilizando a microextração em fase sólida por headspace com cromatografia gasosa e espectrometria de massas.** Quim. Nova, Vol. 34, No. 7, 1260-1264, 2011.

43. CARLOS, E. A. **Determinação simultânea de trialomitanos e agrotóxicos em água empregando microextração em fase sólida e microextração em gota única por cromatografia gasosa.** 2011, 89 f. Tese (doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Minas gerais. Programa de pós-graduação em agroquímica.
44. MARONEZE, A. M. **Validação de procedimento analítico empregando SPE e GC-ECD para determinação de pesticidas organoclorados em água e avaliação da permeabilidade destes em dialisadores utilizados em hemodiálise.** Dissertação de mestrado. 2004 101 f. Universidade Federal de Santa Maria. Programa de pós-graduação em química.
45. SCHNEIDER, S. E. **Determinação de Agrotóxicos e Fármacos em Água Empregando Extração em Fase Sólida, GC-MS e UHPLCMS/MS.** Dissertação de Mestrado. 2013 135 f. Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental. Escola de Química e Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande.